

检测急性早幼粒细胞白血病 PML/RAR α 融合基因的电化学传感器研制

冯美娟¹, 雷 云¹, 王 昆³, 陈元仲², 李光文¹, 罗红斌¹, 林新华¹

(1. 福建医科大学 药学院 药物分析系, 福建 福州 350004; 2. 福建医科大学 福建协和医院, 福建 福州 350004; 3. 厦门大学第一附属医院, 福建 厦门 361003)

摘 要: 针对急性早幼粒细胞白血病 (APL) 中 PML/RAR α 融合基因的碱基序列, 设计了锁核酸 (LNA) 修饰的发夹结构捕获探针, 结合信号探针构建新型的“三明治”电化学传感模式。信号探针末端修饰的生物素可与酶上的亲和素结合, 通过检测酶催化 H₂O₂ 氧化底物 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 产生的电化学信号, 实现对靶序列的检测。该传感器可识别和定量检测 PBS 缓冲液中人工合成的 PML/RAR α 融合基因序列。结果表明, 该传感器能很好地区分互补序列、单碱基及多碱基错配序列, 杂交电流值与目标链浓度在 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.6 \times 10^{-10}$ mol/L 范围内呈较好的线性关系, 检出限为 1.0×10^{-13} mol/L。同时, 该新型传感器成功地用于无稀释人血清中 PML/RAR α 融合基因的检测, 具有特异性强、灵敏度高和重复性好的优点, 有望用于临床实际样品的检测, 进而实现临床上急性早幼粒细胞白血病的早期诊断及预后判断。

关键词: 电化学传感器; “三明治”结构; 发夹结构 DNA 探针; 锁核酸; PML/RAR α 融合基因

中图分类号: O657.72; TQ413.213 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2011)05-0492-06

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2011.05.004

Development of Electrochemical Biosensor for Detection of PML/RAR α Fusion Gene in Acute Promyelocytic Leukemia

FENG Mei-juan¹, LEI Yun¹, WANG Kun³, CHEN Yuan-zhong²,
LI Guang-wen¹, LUO Hong-bin¹, LIN Xin-hua¹

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, Faculty of Pharmacy, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China;
2. Union Hospital, Fujian Medical University, Fuzhou 350004, China; 3. The First Affiliated Hospital of Xiamen University, Xiamen 361003, China)

Abstract: A novel DNA electrochemical probe (locked nucleic acid, LNA) was designed and involved in constructing an electrochemical DNA biosensor for the detection of PML/RAR α fusion gene in acute promyelocytic leukemia (APL). This biosensor was based on a “sandwich” detection strategy, which involved a pair of LNA probes, e. g. hairpin capture probe and reporter probe. Streptavidin-HRP was bound to biotin labeled at the end of reporter probe via streptavidin-biotin affinity binding. In the presence of hydrogen peroxide (H₂O₂), HRP catalyzed the oxidation of the substrate 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine (TMB) to offer an enzymatically amplified electrochemical current signal for the detection of target DNA. This sensor was applied in the direct quantitative detection of synthetic PML/RAR α fusion gene in PBS buffer. The results indicated that the biosensor showed an excellent specificity to distinguish the complementary sequence and different mismatch sequences. A linear relationship between the amperometric signal and the target concentration was obtained in the range of $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.6 \times 10^{-10}$ mol/L with a detection limit of 1.0×10^{-13} mol/L. In addition, the biosensor was used for the determination of PML/RAR α fusion gene in human serum samples without dilution with high sensitivity, selectivity and good repeatability. This method would be expected to use in real sample for further solving the actual problems of early diagnosis and prognosis monitoring of APL.

收稿日期: 2010-12-12; 修回日期: 2011-01-04

基金项目: 863 计划资助项目 (2008AA02Z433); 福建省高校产学研科技重点项目 (2010Y4003); 国家自然科学基金资助项目 (20805006, 20975021); 福建省自然科学基金资助项目 (2010J05019)

通讯作者: 林新华, Tel: 0591-22862016, E-mail: xinhua63@163.com

Key words: electrochemical biosensors; sandwich structure; hairpin DNA probe; locked nucleic acid; PML/RAR α fusion gene

急性早幼粒细胞白血病 (Acute promyelocytic leukemia, APL) 是一种临床表现十分凶险的急性白血病, 95% 以上的 APL 患者有 t(15; 17)(q22; q21) 染色体易位, 造成早幼粒细胞白血病 (Promyelocytic leukemia, PML) 基因与维甲酸受体 α (Retinoic acid receptor α , RAR α) 基因重排, 形成特异性的 PML/RAR α 融合基因。该基因是 APL 高度特异的恶性克隆标志基因, 对 APL 早期诊断和预后监测具有重要意义^[1-3]。目前 PML/RAR α 融合基因的检测方法主要包括染色体分析、Southern - Blot、RT - PCR 及 FISH 等技术^[4-7], 但这些方法均存在一定的缺陷, 如特异性不高、敏感性低、操作繁琐、检测费用高等, 限制了其在临床中的应用。

电化学生物传感器具有选择性好、灵敏度高、分析快速、成本低等特点, 在环境监测、临床诊断、农残分析、食品药品工业等领域具有广泛的应用前景^[8-10]。锁核酸 (Locked nucleic acid, LNA) 作为一种特殊的双环状核苷酸衍生物, 其结构中核酸的 2'-O, 4'-C 位通过不同的缩水作用形成刚性结构, 具有高杂交亲和力^[11]、高特异性^[12]、抗核酸酶降解^[13] 及水溶性好^[14] 等优势, 已在研究领域引起人们的广泛关注; 同时, 基于分子信标技术研制的发夹 (Hairpin, HP) 结构传感器因具有高度的灵敏性、特异性及操作简便等优点, 近年来得到迅速发展^[15-17]。本文综合两者优势, 针对 APL 中 PML/RAR α 融合基因的碱基序列, 设计了 LNA 修饰的发夹结构捕获探针 (LNA - HP), 结合 LNA 修饰的信号探针构建了新型的“三明治”电化学传感模式, 信号探针末端修饰的生物素可与辣根过氧化物酶 (HRP) 上的亲和素结合, 通过检测 HRP 催化 H₂O₂ 氧化底物 3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB) 而产生的电化学信号, 成功实现了对人工合成的 PML/RAR α 融合基因片段的快速、灵敏识别, 并进一步用于无稀释人血中 PML/RAR α 融合基因的检测, 方法具有特异性强、灵敏度高和重复性好的优点, 有望用于实际样品的检测。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

CHI1030A 电化学分析仪 (上海辰华仪器公司)。采用三电极体系, 工作电极为金电极 (2 mm), 对电极为铂丝电极, 参比电极为 Ag/AgCl 电极。

3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺 (TMB, 美国 Neogen 公司); 辣根过氧化物酶标记亲和素 (北京博奥森生物技术有限公司); 97% 巯基乙醇 (MCH)、牛血清白蛋白 (BSA) 均购自美国 Sigma 公司。PBS 缓冲液由 10 mmol/L 磷酸氢二钠、10 mmol/L 磷酸二氢钠和 1.0 mol/L NaCl 配制, 用磷酸调至 pH 7.4; TE 缓冲液由 10 mmol/L Tris、10 mmol/L EDTA 和 1.0 mol/L NaCl 配制, 用 HCl 调至 pH 7.4。所用试剂均为分析纯, 实验用水为 Milli-Q 水。血清样品由福建医科大学附属协和医院血液科提供。

DNA 探针及各目标链序列均购于宝生物工程 (大连) 有限公司, 序列如下 (序列中 L 表示锁核酸位置, 下划线部分为错配碱基): 发夹结构捕获探针 LNA - HP (S1): 5'SH - C₆ - cgatccG^LAACTGCT - G^LCTCTGGGT^LCTCAATgg^Latcg 3'; c 信号探针 (S2): 5'C^LTGCCCTC^LCCCGGC^LGCCACT^LGGCCAC^LGTGGT - Biotin 3'; PML/RAR α 融合基因 cDNA 片段 (S3): 5'ACCACGTGGCCAGTGGCGCCGGGGAGGCAGCCATT - GAGACCCAGAGCAGCAGTTC3'; 单碱基错配序列 1 (S4): 5'ACCACGTGGCCAGTGGCGCCGGGGAGGAA GCCATTGAGACCCAGAGCAGCAGTTC3'; 单碱基错配序列 2 (S5): 5'ACCACGTGGCCAGTGGCGCCGGGG AGGCAGCCATTGAGACCC^CGAGCAGCAGTTC3'; PML 基因片段 (S6): 5'ACCACGTGGCCAGTGGCGCCGG GGAGGCAGAGGAACGCGTTGTGGTGATCAGCAG3'; RAR α 基因片段 (S7): 5'TTAGTGATATAGCACAC - CATCCCCAGCCACCATTGAGACCCAGAGCAGCAGTTC3'。

1.2 实验方法

1.2.1 探针修饰电极的制备 金电极 (AuE) 先置于浓 H₂SO₄ - 30% H₂O₂ (体积比 3 : 1, Piranha 溶液) 中超声 10 min 后, 用 0.05 μ m 粒度氧化铝粉末和水的混合物抛光至镜面, 再依次置于乙醇、Milli-Q 水中超声清洗。将预处理过的电极于 0.1 mol/L H₂SO₄ 中循环扫描至稳定, 氮气吹干, 在清洗后的电极表面滴加 3 μ L LNA - HP 探针 (S1), 室温固定 30 min 后, 用 Milli-Q 水清洗, N₂ 氮气吹干, 在 1.0 mmol/L

巯基乙醇(MCH)溶液中封闭 1 h, 用 Milli-Q 水清洗, 即得 LNA-HP/MCH/AuE 电极。

1.2.2 杂交溶液的制备 杂交液共 100 μL , 其中含目标 DNA 链(S3)、100 nmol/L 信号探针(S2)及 PBS 缓冲液, 均在杂交前于 94 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 10 min, 取出, 室温自然冷却, 待杂交。

1.2.3 杂交及电化学检测 将 LNA-HP/MCH/AuE 电极浸入含有一定浓度目标 DNA 链的杂交液中杂交 1 h 后, 用 PBS 缓冲液清洗, N_2 吹干, 即得 dsDNA/MCH/AuE 电极。将该电极在室温下于 0.1% BSA 溶液中浸泡 30 min, 封闭残余的非特异性吸附位点。用 PBS 清洗, N_2 吹干, 于 AuE 表面滴加 3 μL HRP, 作用 15 min 后, 置于含有 TMB 和 H_2O_2 的溶液中进行循环伏安和计时电流扫描。实验条件为: 循环伏安扫描的扫描速率 100 mV/s; 计时电流扫描的初始电位 0.1 V, 采样间隔 0.1 s, 实验时间 100 s, 静置时间 0 s。

2 结果与讨论

2.1 修饰电极的电化学性质表征

电化学阻抗谱是检测生物分子修饰电极界面结构的有力工具。将电极置于 0.01 mol/L $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) 的 0.1 mol/L KCl 溶液中, 在初始电位 0.22 V, 频率范围 $10^5 \sim 0.1$ Hz 条件下, 考察电极在不同制备阶段的界面阻抗性质。图 1 为不同电极的电化学阻抗 Nyquist 图。 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在裸 AuE 上的电子传输过程, 半圆直径很小(曲线 a), 表明此时电子在 AuE 表面能够快速传输。当 LNA-HP 探针自组装到 AuE 表面时, 其表面电阻迅速增大(4 202 Ω , 曲线 b), 这主要是因为 AuE 表面的 LNA-HP 探针具有带负电荷的 DNA 磷酸骨架, 排斥带负电荷的 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 到达电极表面进行氧化还原反应, 阻碍了电子传递。MCH 进行封闭后, 电极表面组装更加紧密, 表面电阻进一步增大(11 480 Ω , 曲线 c)。当探针与其互补 DNA 杂交反应后, 电极表面的负电荷数量继续增加, 进一步排斥 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 在电极表面进行电子交换, 电极表面的电阻(9 533 Ω , 曲线 d)相比 LNA-HP/AuE 的阻值增大, 但比 MCH 封闭后的阻值小, 原因可能是相比于直链探针, 发夹捕获探针占据了更多电极表面, 杂交后部分捕获探针的茎环结构打开, 致使裸露的电极表面增多^[18]。

2.2 电化学测定原理

考察了 HRP-LNA-HP/MCH/AuE、dsDNA/MCH/AuE 及 HRP-dsDNA/MCH/AuE 在 TMB 中的计时电流图和循环伏安图(见图 2)。由图 2A 可知, 在 dsDNA/MCH/AuE 表面滴加 3 μL HRP 后, 电流信号(曲线 c)较滴加前(曲线 a)明显放大, 说明“三明治”传感模式构建成功, 信号探针末端修饰的生物素与 HRP 上的亲和素结合, 将酶固定在电极表面, 在 HRP 的催化作用下, H_2O_2 能催化氧化 TMB 生成双偶氮联苯胺类物质, 从而产生了明显的电流放大信号。同时, 在 LNA-HP/MCH/AuE 表面滴加 3 μL HRP, 并没有出现明显的电催化现象(曲线 b)。因 LNA-HP/MCH/AuE 未进行杂交反应, 不含信号探针, HRP 无法键合到电极表面, 进一步证明了该方法的特异性, 与图 2B 的循环伏安法扫描结果一致。

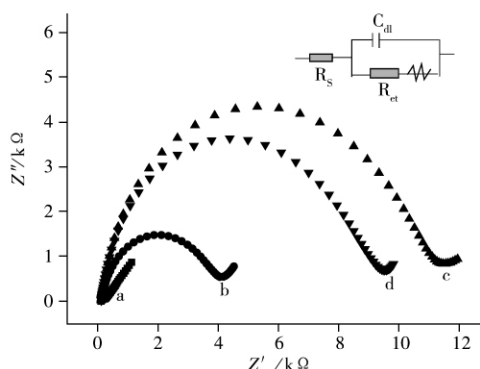


图 1 不同电极在 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 中的交流阻抗图

Fig. 1 Nyquist plots of different electrodes in $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ solution

a. bare AuE, b. LNA-HP/AuE, c. LNA-HP/MCH/AuE, d. dsDNA/MCH/AuE

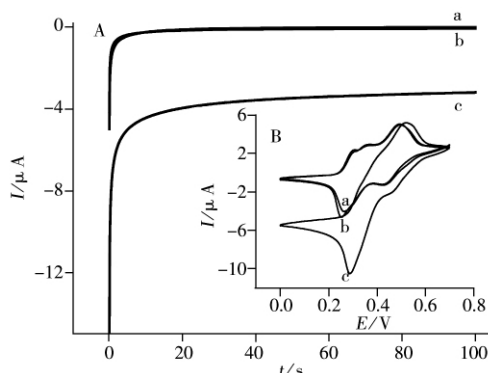


图 2 TMB 分别在不同修饰电极上的计时电流曲线(A)与循环伏安图(B)

Fig. 2 Chronoamperometric curves (A) and cyclic voltammograms (B) of TMB substrate at different modified electrodes

a. dsDNA/MCH/AuE; b. HRP-LNA-HP/MCH/AuE; c. HRP-dsDNA/MCH/AuE

2.3 实验参数的优化

2.3.1 探针自组装时间的选择 采用交流阻抗法对自组装时间进行考察。结果表明, LNA-HP 在电极表面的固定量随着组装时间的延长而增加, 30 min 后, 组装量变化不明显。用计时电流法检测不同自组装时间修饰电极的杂交信号, 发现组装 30 min 后的杂交电流稳定, 与交流阻抗法的结果一致, 因此选择探针自组装时间为 30 min。

2.3.2 探针组装浓度的选择 将预处理过的电极分别浸泡在 0.01、0.1、1、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 LNA-HP 探针溶液中自组装 30 min, 采用计时电流法考察, 结果表明, 探针浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时, 杂交电流信号值最大。

2.3.3 杂交溶液离子强度的选择 一价阳离子如 Na^+ 的存在可以提高异源杂交双链的生成速率, 随着离子强度的增加, 杂交反应率增加, 但当 NaCl 的浓度超过 1.0 mol/L 后, 杂交反应率变化不明显。因此, 选取含 1.0 mol/L NaCl 的 PBS 缓冲溶液作为杂交底液。

2.3.4 杂交温度与杂交时间的选择 采用计时电流法考察了温度分别为 25、35、45、55、65 $^{\circ}\text{C}$ 时, 探针与 10 nmol/L 互补序列(S3)的杂交情况。结果表明, 温度高于 35 $^{\circ}\text{C}$ 后, 杂交 1 h 的电流信号变化不大, 且温度越高, 峰电流达到最大值的时间越短。但温度过高, 捕获探针的发夹结构打开, 特异性下降^[18]。综上, 选择在 35 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 1 h。

2.3.5 酶修饰时间的选择 目标 DNA 在电极表面杂交完全后, 滴加 3 μL HRP, 考察酶作用时间与电流的关系。结果表明, 随着时间的延长, 电流值先增大, 随后基本保持不变, 当反应时间达 15 min 时, 电流值最大。因此酶修饰时间选择 15 min。

2.4 传感器的选择性

采用计时电流法考察了探针(S1、S2)与不同序列(S3、S4、S5、S6、S7)杂交后的信号。实验中设计合成两条不同的单碱基错配序列(S4、S5), 序列 S4 的错配位点位于整个互补序列的中间, 序列 S5 的错配位点位于捕获探针对应互补序列的中间。结果发现(图 3A), 序列 S4 与 S5 的电流(曲线 b、c)均明显小于靶标序列 S3(曲线 a)的电流, 说明该传感器对单个碱基错配序列具有较好的识别作用; 基于正常人与病人细胞中均含有 PML 及 RAR α 基因, 实验进一步考察了传感器对这两种基因序列的选择性。PML(S6)序列与 RAR α (S7)序列中均只有一半为互补序列, 分别与信号探针或捕获探针互补, 杂交后的电流(曲线 d、e)与空白电流(曲线 f)几乎一致, 说明 S6、S7 序列均不能与探针构成“三明治”结构。图 3B 为该探针与不同碱基序列杂交后相关电流的条形图。研究表明, 该传感器能够较好地识别互补序列、单碱基错配序列与 PML 及 RAR α 序列。

2.5 传感器检测的线性范围与检出限

采用计时电流法对 PML/RAR α 融合基因片段(S3)进行定量考察。在最佳条件下, 将 LNA-HP 探针修饰电极分别插入一系列不同浓度的杂交溶液中, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 杂交 60 min, 其时间电流曲线见图 4A。在 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ mol/L 范围内, 电流值(I)与 DNA 浓度(c)呈非线性对数关系。在 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.6 \times 10^{-10}$ mol/L 范围呈较好的线性关系(图 4B), 回归方程为 $I(\mu\text{A}) = 0.1606 + 5.702c_{\text{DNA}}(\text{pmol/L})$, $r^2 = 0.9933$, 检出限($S/N = 3$)为 1.0×10^{-13} mol/L。对 1.0×10^{-10} mol/L 的靶 DNA 溶液平行测定 5 次, 相对标准偏差为 8.6%。结果表明, 该传感器具有较好的重复性。

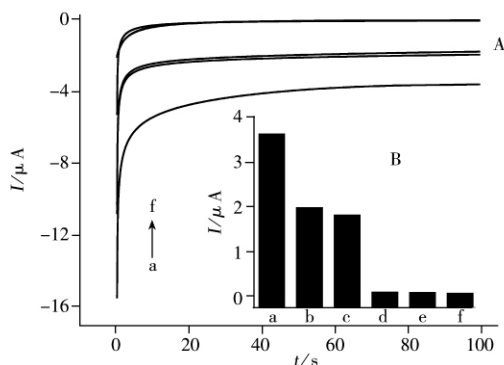


图3 LNA 探针与不同序列杂交后的计时电流曲线图(A)与条形图(B)

Fig. 3 Chronoamperometric curves (A) and bar graph (B) of DNA probe after hybridizing with different sequence a. complementary target sequence, b. single-base mismatch sequence 1, c. single-base mismatch sequence 2, d. PML-DNA sequence, e. RAR α -DNA sequence, f. current-time curves of background; all concentration of the sequence were 10 nmol/L

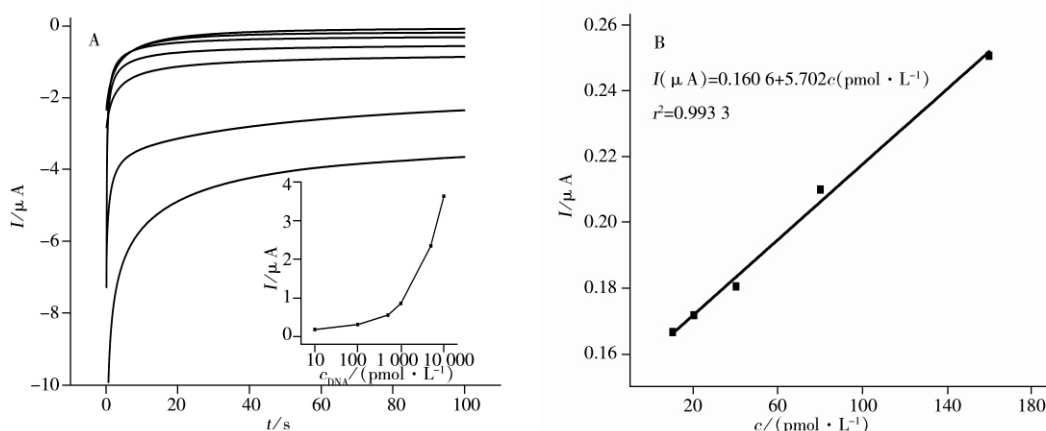


图 4 不同浓度的目标链杂交计时电流图 (A) 及电流强度与目标 DNA 浓度的线性关系图 (B)

Fig. 4 Current - time curves of hybridization of different concentration of target sequences (A)

and linear plot of current vs target DNA concentration (B)

concentration of target sequence (from bottom to top): 10 000, 5 000, 1 000, 500, 100, 10, 0 pmol/L, insert shows logarithmic plot of currents versus target DNA concentration

2.6 血清中靶 DNA 的检测

采用计时电流法检测了不同浓度的互补链 (S3) 在血清中的杂交信号, 结果表明, LNA - HP 探针修饰的电极有着较好的抗蛋白质非特异性吸附能力, 目标链 (1 nmol/L) 在血清中的杂交信号与在 PBS 杂交缓冲液中一致, 检出限可低至 10 pmol/L (检测信号大于空白标准偏差的 3 倍)。同时, 检测了探针与不同序列 (S3、S4、S5、S6、S7) 在血清中杂交后的电流信号, 发现传感器的选择性与在纯 PBS 杂交体系中一致。

2.7 电极的再生

测量后的电极浸入热的杂交缓冲液 (大于 95 °C) 中 5 min, 可除去杂交的目标 DNA 链和检测探针并将捕获探针保留在电极表面, 之后迅速浸入冰水中冷却使电极再生。采用计时电流法检测杂交信号, 发现 LNA - HP/MCH/AuE 电极重复使用 5 次时, 仍有很好的重复性 (RSD = 2.7%, $n = 5$)。

3 结 论

本文通过设计锁核酸 (LNA) 修饰的发夹结构寡核苷酸作为捕获探针, 与信号探针及目标链杂交形成新型的 “三明治” 传感模式, 用于 APL 中 PML/RARa 融合基因的检测。结果表明, 该传感器能够很好地识别互补链与单碱基错配链, 具有较高的特异性。在优化条件下, 目标 DNA 在 $1.0 \times 10^{-11} \sim 1.6 \times 10^{-10}$ mol/L 浓度范围内, 与电流值 (I) 呈较好的线性关系 ($r^2 = 0.9933$), 检出限为 1.0×10^{-13} mol/L, 具有良好的重复性与可再生性。同时在血清中的检出限可低至 10 pmol/L, 具有较好的抗蛋白质非特异性吸附能力, 有望用于临床实际样品的检测。

参考文献:

- [1] LARSON R A, KONDO K, VARDIMAN J W, BUTLER A E, GOLOMB H M, ROWLEY J D. Evidence for a 15; 17 translocation in every patient with acute promyelocytic leukemia [J]. Am J Med, 1984, 76(5): 827 - 841.
- [2] DE THE H, CHOMIENNE C, LANOTTE M, DEGOS L, DEJEAN A. The t(15; 17) translocation of acute promyelocytic leukaemia fuses the retinoic acid receptor alpha gene to a novel transcribed locus [J]. Nature, 1990, 347(6293): 558 - 561.
- [3] 邱莹玉, 高凌霄, 刘翠英. 急性早幼粒细胞白血病 46 例临床分析 [J]. 中国当代医药, 2010, 17(22): 20 - 21.
- [4] YOO S J, SEO E J, LEE J H, SEO Y H, PARK P W, AHN J Y. A complex, four-way variant t(15; 17) in acute promyelocytic leukemia [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2006, 167(2): 168 - 171.
- [5] HAN J Y, KIM K E, KIM K H, PARK J I, KIM J S. Identification of PML - RARA rearrangement by RT - PCR and sequencing in an acute promyelocytic leukemia without t(15; 17) on G-banding and FISH [J]. Leukemia Res, 2007, 31(2): 239 - 243.

- [6] AMARE P S , BAISANE C , SAIKIA T , NAIR R , GAWADE H , ADVANI S. Fluorescence in situ hybridization: a highly efficient technique of molecular diagnosis and predication for disease course in patients with myeloid leukemias [J]. *Cancer Genet Cytogenet* , 2001 , 131 (2) : 125 – 134.
- [7] MILLER W H , LEVINE K , DEBLASIO A , FRANKEL S R , DMITROVSKY E , WARRELL R P. Detection of minimal residual disease in acute promyelocytic leukemia by a reverse transcription polymerase chain reaction assay for the PML/RAR – alpha fusion mRNA [J]. *Blood* , 1993 , 82 (6) : 1689 – 1694.
- [8] 陈婧, 陈敬华, 陈元仲, 林启凰, 罗红斌, 李光文, 林新华. 新型“三明治”结构 DNA 电化学传感器对急性早幼粒细胞白血病相关融合基因的检测 [J]. *分析测试学报* , 2009 , 28 (12) : 1357 – 1361.
- [9] CHEN J H , ZHANG J , WANG K , LIN X H , HUANG L Y , CHEN G N. Electrochemical biosensor for detection of BCR/ABL fusion gene using locked nucleic acids on 4-aminobenzenesulfonic acid-modified glassy carbon electrode [J]. *Anal Chem* , 2008 , 80 (21) : 8028 – 8034.
- [10] 魏娜, 陈敬华, 王昆, 李光文, 罗红斌, 蔡婉婷, 林新华. 发夹结构 DNA 探针用于检测白血病 PML/RARA 融合基因的电化学传感器的研究 [J]. *分析测试学报* , 2008 , 27 (9) : 907 – 910.
- [11] WENGEL J , PETERSEN M , NIELSEN K E , JENSEN G A , HAKANSSON A E , KUMAR R , SORESENSEN M D , RAJWANSKI V K , BRYLD T , JACOBSEN J P. LNA (locked nucleic acid) and the diastereoisomeric alpha-L-LNA: conformational tuning and high-affinity recognition of DNA/RNA targets [J]. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* , 2001 , 20 (4/7) : 389 – 396.
- [12] JACOBSEN N , BENTZEN J , MELDGAARD M , JAKOBSEN M H , FENGER M , KAUPPINEN S , SKOUV J. LNA-enhanced detection of single nucleotide polymorphisms in the apolipoprotein E [J]. *Nucleic Acids Res* , 2002 , 30 (19) : e100.
- [13] KURRECK J , WYSZKO E , GILLEN C , ERDMANN V A. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids [J]. *Nucleic Acid Res* , 2002 , 30 (9) : 5160 – 5167.
- [14] WAHLESTEDT C , SALMI P , GOOD L. Potent and nontoxic antisense oligonucleotides containing locked nucleic acids [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2000 , 97 (10) : 5633 – 5638.
- [15] MARTINEZ K , ESTEVEZ M C , WU Y R , PHILLIPS J A , MEDLEY C D , TAN W H. Locked nucleic acid based beacons for surface interaction studies and biosensor development [J]. *Anal Chem* , 2009 , 81 (9) : 3448 – 3454.
- [16] YANG C Y J , WANG L , WU Y R , KIM Y , MEDLEY C D , LIN H , TAN W H. Synthesis and investigation of deoxy-ribonucleic acid/locked nucleic acid chimeric molecular beacons [J]. *Nucleic Acids Res* , 2007 , 35 (12) : 4030 – 4041.
- [17] WANG L , YANG C Y , MEDLEY C D , BENNER S A , TAN W H. Locked nucleic acid molecular beacons [J]. *J Am Chem Soc* , 2005 , 127 (45) : 15664 – 15665.
- [18] KJALLMAN T H M , PENG H , SOELLER C , TRAVAS – SEJDIC J. Effect of probe density and hybridization temperature on the response of an electrochemical hairpin-DNA sensor [J]. *Anal Chem* , 2008 , 80 (24) : 9460 – 9466.

《分析测试学报》关于“新仪器、新方法展示专场”栏目的征稿说明

随着科技的不断进步,分析技术的进步越来越倚重分析仪器的发展和创新。为促进国内外新型分析仪器的展示与分析方法的交流,提高我国分析技术研究实力和水平,《分析测试学报》特新开设了“新仪器、新方法展示专场”栏目。栏目征稿要求及说明如下:

一、征稿内容: 国内外新开发或刚投入市场的分析仪器及其实际应用介绍。具体内容包括: ①仪器装置: 包括设备名称、型号,仪器照片或仪器结构示意图,制造厂商等; ②仪器原理简介; ③技术指标; ④应用范围; ⑤实例与应用: 包括特征样品的前处理方法、谱图、分析参数(准确度、精密度、检出限数据及线性范围等)。

二、稿件格式: 标题3号黑体,公司名字小5号宋体,正文5号宋体,一级标题4号黑体,二级标题小4号黑体,表题及图题小5号宋体,表内及图内文字为6号宋体。

三、字数要求: 不超过3000字/篇,即不超过本刊2个版面。

四、该栏目文章将同时上传到本刊网站,供广大读者阅读,以扩大影响。

五、本刊将定期对该栏目中的新仪器进行汇总、分类,向广大作者、读者推介,并将读者对于新仪器的相关意见反馈给仪器厂商。